

(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION
EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

VERSION CORRIGÉE

(19) Organisation Mondiale de la Propriété
Intellectuelle
Bureau international



(43) Date de la publication internationale
10 janvier 2002 (10.01.2002)

PCT

(10) Numéro de publication internationale
WO 02/02595 A1

(51) Classification internationale des brevets⁷ : C07K 7/08,
A61K 38/10, A61P 31/04

(21) Numéro de la demande internationale :
PCT/FR01/02129

(22) Date de dépôt international : 3 juillet 2001 (03.07.2001)

(25) Langue de dépôt : français

(26) Langue de publication : français

(30) Données relatives à la priorité :
00/08633 3 juillet 2000 (03.07.2000) FR

(71) Déposant (pour tous les États désignés sauf US) :
SYNT:EM S.A. [FR/FR]; Parc Scientifique Georges
Besse, F-30000 Nîmes (FR).

(72) Inventeurs; et

(75) Inventeurs/Déposants (pour US seulement) : DRIN,
Guillaume [FR/FR]; 71, rue du Champ d'Azur, F-34090
Montpellier (FR). GOMAR, Jérôme [FR/FR]; 123, rue
Robert de Joly, F-30620 Uchaud (FR). TEMSAMANI,
Jamal [MA/FR]; Résidence de l'Empereur, Bâtiment B,
26, chemin des Carrières, F-30900 Nîmes (FR). REES,
Anthony, R. [GB/FR]; Mas de la Font, Castelnau Valence,
F-30190 Saint-Chaptes (FR).

(74) Mandataires : BREESE, Pierre etc.; Breese-Majerowicz,
3, avenue de l'Opéra, F-75001 Paris (FR).

(81) États désignés (national) : AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ,
BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ,
DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM,
HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK,
LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX,
MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL,
TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

(84) États désignés (régional) : brevet ARIPO (GH, GM, KE,
LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), brevet eurasién
(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet européen
(AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU,
MC, NL, PT, SE, TR), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI,
CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Publiée :

— avec rapport de recherche internationale

(48) Date de publication de la présente version corrigée:
28 mars 2002

(15) Renseignements relatifs à la correction:
voir la Gazette du PCT n° 13/2002 du 28 mars 2002, Section
II

En ce qui concerne les codes à deux lettres et autres abrévia-
tions, se référer aux "Notes explicatives relatives aux codes et
abréviations" figurant au début de chaque numéro ordinaire de
la Gazette du PCT.

(54) Title: AMPHIPATHIC LINEAR PEPTIDES AND COMPOSITIONS CONTAINING SAME

(54) Titre : PEPTIDES LINEAIRES AMPHIPATHIQUES ET LES COMPOSITIONS LES CONTENANT

(57) Abstract: The invention concerns peptides containing or consisting of an antibiotic peptide by (i) modification of cysteine residues so that said peptide is devoid of disulphide bond, (ii) substitution of 1 to 18 and preferably of 1 to 5 amino acids, and/or permutation of at least a pair of amino acids, said substitutions and/or permutations being such that said peptide has an amphipathic character. The invention also concerns a compound formed by at least one of said peptide directly or indirectly bound to at least an active substance.

(57) Abrégé : La présente invention a pour objet des peptides contenant ou constitués par un dérivé d'un peptide antibiotique par (i) modification des résidus cystéines de façon à ce que ledit peptide soit dépourvu de pont disulfure, (ii) substitution de 1 à 18 et de préférence de 1 à 6 acides aminés, et/ou permutation d'au moins une paire d'acides aminés, lesdites substitutions et/ou permutations étant telles que ledit peptide présente un caractère amphipathique. L'invention concerne aussi un composé formé d'au moins un desdits peptides lié directement ou indirectement à au moins une substance active.

WO 02/02595 A1

PEPTIDES LINEAIRES AMPHIPATHIQUES ET LES
COMPOSITIONS LES CONTENANT.

La présente invention concerne des peptides linéaires et leur utilisation pour vectoriser des substances actives. Plus particulièrement, l'invention se rapporte à des peptides linéaires fortement amphotériques dérivés de peptides antibiotiques ou de leurs analogues. L'invention a aussi pour objet de nouveaux composés formés d'un peptide linéaire amphotérique lié à au moins une substance active, ainsi que la préparation de ces composés et les compositions les contenant.

Le problème de l'entrée dans les cellules vivantes de différentes substances dotées de propriétés pharmacologiques revêt un grand intérêt tant pour la recherche que pour des utilisations thérapeutiques ou diagnostiques.

Une des priorités des travaux dans ce domaine est de trouver des moyens efficaces pour augmenter l'efficacité de pénétration des substances actives, qu'il s'agisse de molécules conventionnelles, que de peptides, protéines, ou encore acides nucléiques comme les oligonucléotides dans les cellules vivantes.

Plusieurs stratégies sont proposées pour permettre ou augmenter le passage de ces substances à travers la membrane des cellules. Parmi celles-ci, la Demanderesse a développé un système de transport de substances actives à travers la membrane des cellules mettant en œuvre des peptides vecteurs. Cette stratégie de vectorisation offre de nombreux avantages, car le peptide vecteur peut être synthétisé par voie chimique, et la plupart des substances actives citées ci-dessus peuvent être couplées au vecteur de façon simple et efficace.

Les protégrine et tachyplesine sont des peptides naturels dont la structure est de type épingle à cheveux maintenue par des ponts disulfures. Ces ponts jouent un rôle

important dans l'activité cytolytique observée sur cellules humaines. Les travaux de recherche réalisés par la Demanderesse sur ces peptides lui ont permis de découvrir qu'une réduction irréversible de ces ponts disulfures permet de générer des peptides linéaires qui ont la propriété de passer rapidement au travers des membranes cellulaires. Ces peptides linéaires et leur utilisation comme vecteur pour des substances actives sont décrits dans la demande de brevet internationale PCT publiée sous le No. WO99/07728.

La Demanderesse a maintenant cherché à définir de nouvelles séquences d'acides aminés capables de servir de vecteur d'internalisation et d'adressage de substances actives et, dans ce but, plusieurs peptides présentant des propriétés physico-chimiques améliorées ont été synthétisés.

L'invention a donc pour objet un peptide linéaire contenant ou constitué par un dérivé d'un peptide antibiotique par :

- modification des résidus cystéines de façon à ce que ledit peptide soit dépourvu de pont disulfure,
- substitution de 1 à 18 et de préférence de 1 à 6 acides aminés, et/ou permutation d'au moins une paire d'acides aminés, lesdites substitutions et/ou permutations étant telles que ledit peptide présente un caractère amphipathique.

On entend par peptides antibiotiques, des peptides de plus de 5 à 7 acides aminés présentant une activité cytolytique sur des cellules humaines ou animales. Il s'agit de peptides d'origine naturelle ou de peptides de synthèse et de fragments de ceux-ci. L'invention envisage tout particulièrement des peptides dérivés de protégrine et de tachyplésine, un analogue ou un fragment de ceux-ci.

Les peptides de l'invention sont dépourvus de pont disulfure comme ceux décrits par exemple dans la demande de brevet internationale PCT publiée sous le No.

WO99/07728. L'absence de ponts disulfures dans les peptides de l'invention peut être obtenue par toute technique connue de l'homme du métier et notamment en supprimant ou en remplaçant par d'autres acides aminés les résidus de cystéines ou en bloquant les groupes -SH de façon à ce qu'ils ne forment plus de pont disulfure.

Le caractère amphipathique des peptides de l'invention a été exprimé par la valeur de l'hydrophobicité moyenne par résidu $\langle H \rangle$ et le moment d'hydrophobicité hélicoïdal $\langle \mu H \rangle_\alpha$. Avantageusement, les peptides de l'invention présentent :

- une hydrophobicité moyenne par résidu $\langle H \rangle$ comprise entre 0,15 et 0,7 ;
- un moment d'hydrophobicité hélicoïdal $\langle \mu H \rangle_\alpha$ supérieur à 0,15 ;
- un moment d'hydrophobicité bêta $\langle \mu H \rangle_\beta$ supérieur à 0.

Les travaux de recherche effectués dans le cadre de la présente invention ont en effet concerné trois paramètres permettant d'orienter la conception de séquences primaires à partir de séquences de référence (Eisenberg et al., 1982 ; The helical hydrophobic moment : a measure of the amphiplicity of helix. Nature 299, 371-374). Les trois paramètres choisis ont été les suivants :

- l'hydrophobicité moyenne par résidu,
- le moment d'hydrophobicité hélicoïdale,
- le moment d'hydrophobicité bêta.

L'hydrophobicité moyenne par résidu est une mesure du caractère apolaire d'un peptide. La quantification de l'hydrophobicité d'un peptide s'effectue par sommation de la contribution de chaque résidu à cette hydrophobicité suivant la formule :

$$\langle H \rangle = \frac{1}{N} \sum_{n=1}^N H_n$$

dans laquelle, H correspond à l'hydrophobicité moyenne par résidu, N représente le nombre de résidu, H_n représente l'indice d'hydrophobicité du résidu n. L'échelle d'hydrophobicité utilisée est celle de Fauchète et Pliska (1983, Eur. J. Med. Chem 18.369-375). La sommation s'effectue sur tous les résidus de l'hélice (de $n = 1$ à N).

Le moment d'hydrophobicité hélicoïdale $\langle \mu H \rangle_\alpha$ permet de quantifier le caractère plus ou moins amphiphile d'une l'hélice α suivant la formule :

$$\langle \mu H \rangle = \frac{1}{N} \left(\left[\sum_{n=1}^N H_n \sin(\delta n) \right]^2 + \left[\sum_{n=1}^N H_n \cos(\delta n) \right]^2 \right)^{1/2}$$

dans laquelle H correspond à l'indice d'hydrophobicité du résidu n et δ correspond à l'angle entre 2 résidus successifs (100° pour une hélice α).

A chaque acide aminé, il est assigné un vecteur dont la direction correspond à la droite reliant le centre de la roue à sa position sur cette roue. La norme de ce vecteur est égale à l'indice d'hydrophobicité de l'acide aminé. Le sens du vecteur va du centre vers l'acide aminé si l'acide aminé est hydrophobe (valeur positive dans l'échelle d'hydrophobicité) et de l'acide aminé vers le centre si l'acide aminé est polaire (valeur négative dans l'échelle d'hydrophobicité).

Le moment d'hydrophobicité par acide aminé de l'hélice amphiphile est égal à la norme du vecteur résultant de la sommation de tous ces vecteurs, divisés par le nombre d'acides aminés de l'hélice. La sommation s'effectue sur tous les résidus de l'hélice (de $n = 1$ à N). Le vecteur résultant pointe dans la direction de la zone la plus hydrophobe de la roue.

Le moment d'hydrophobicité bêta $\langle \mu H \rangle_\beta$ correspond au moment d'hydrophobicité d'un peptide qui adopterait une structure en feuillet β . Le moment d'hydrophobicité bêta est

calculé comme le paramètre $\langle \mu H \rangle \alpha$ mais avec dans ce cas, δ , qui correspond à l'angle entre 2 résidus successifs, est égal à 180° .

L'étude des trois paramètres ci-dessus a été appliquée à trois peptides de référence :

- deux peptides dérivés de protégrine désignés SynB1 et SynB3,
- un peptide dérivé de tachyplésine désigné SynB4.

Les substitutions d'acides aminés réalisées sur les peptides SynB1, SynB3 et SynB4 rapportés ci-après ont permis d'identifier les modifications de séquences conduisant à des peptides fortement amphipathiques.

L'invention se rapporte tout particulièrement à un peptide comprenant ou constitué par un dérivé d'un peptide dont la séquence en acides aminés est :

1 5 10 15 18
- R G G R L S Y S R R R F S T S T G R

1 5 10
- R R L S Y S R R R F

1 5 10 15 17
- A W S F R V S Y R G I S Y R R S R

- ou un fragment de celles-ci constitué d'au moins cinq et de préférence d'au moins sept acides aminés successifs,

par substitution de 1 à 18 et de préférence de 1 à 6 acides aminés, et/ou permutation d'au moins une paire d'acides aminés, lesdites substitutions et/ou permutations étant telles que ledit peptide présente un caractère amphipathique.

Dans les séquences peptidiques rapportées ci-après, les acides aminés sont représentés par leur code à une lettre, mais ils peuvent être aussi représentés par leur code à trois lettres selon la nomenclature ci-dessous.

A	Ala	alanine
C	Cys	cystéine

D	Asp	acide aspartique
E	Glu	acide glutamique
F	Phe	phénylalanine
G	Gly	glycine
H	His	histidine
I	Ile	isoleucine
K	Lys	lysine
L	Leu	leucine
M	Met	méthionine
N	Asn	asparagine
P	Pro	proline
Q	Gln	glutamine
R	Arg	arginine
S	Ser	sérine
T	Thr	thréonine
V	Val	valine
W	Trp	tryptophane
Y	Tyr	tyrosine

1) Mutation du peptide SynB1.

1.1) Augmentation de l'hydrophobicité <H> de SynB1.

Les mutations suivantes augmentent le paramètre <H>, c'est-à-dire l'hydrophobicité moyenne par résidu :

- la mutation d'au moins un des résidus en position 6, 8, 13, 14, 15, 16 par un acide aminé hydrophobe, de préférence choisi parmi le groupe comprenant : Ala, Ile, Leu, Val, Phe, Trp,

- éventuellement la mutation d'au moins un autre résidu, de préférence le résidu Phe en position 12, par un résidu Tyr ou Trp donnant un signal spectroscopique et permettant le dosage du peptide.

Le tableau 1 ci-dessous rapporte des mutations permettant d'augmenter l'hydrophobicité de SynB1 et donne des exemples de peptides selon l'invention dérivés de SynB1.

Tableau 1

		<H>	< μ H> α
SynB1	R G G R L S Y S R R R F S T S T G R	-0,069	0,18
	A A W A A A A		
	I I I I I I		
	L L L L L L		
	V V V V V V		
	F F F F F F		
	W W W W W W		
SM3979	R G G R L A Y L R R R W A V L V G R	0,295	0,27
SM3980	R G G R L V Y V R R R W V V V V G R	0,343	0,25
PG-4L	R G G R L L Y L R R R W L V L V G R	0,45	0,27
PG-4A	R G G R L A Y A R R R F A V A V G R	0,115	0,2
PG-AFL1	R G G R L V Y L R R R F A F L I G R	0,384	0,23

1.2) Augmentation de l'amphipathicité de SynB1.

Les mutations ci-dessous augmentent les paramètres <H> et < μ H> α , c'est-à-dire l'hydrophobicité moyenne par résidu et l'amphipathicité hélicoïdale moyenne par résidu :

- la permutation d'au moins une paire des résidus en position 3 et 5, en position 10 et 12, et en position 16 et 17,

- la mutation d'au moins un des résidus en position 6, 13, 14 et 16 par un acide aminé hydrophobe, de préférence choisi parmi le groupe comprenant : Ala, Ile, Leu, Val, Phe, Trp,

- éventuellement la mutation d'au moins un autre résidu, de préférence le résidu Phe en position 12, par un résidu Tyr ou Trp donnant un signal spectroscopique et permettant le dosage du peptide,

- éventuellement la mutation du résidu en position 3 par un acide aminé hydrophobe, de préférence choisi parmi le groupe comprenant : Ile, Leu, Val, Phe, Trp.

Le tableau 2 ci-dessous rapporte les mutations permettant d'augmenter l'amphipathicité de SynB1 et donne des exemples de peptides selon l'invention dérivés de SynB1.

Tableau 2

		<H>	< μ H> α
SynB1	R G G R L S Y S R R R F S T S T G R	-0,069	0,18
A-Synb1	R G L R G S Y S R F R R S T S T G R	-0,069	0,37
	V A W A A A		
	I V V V V		
	F I I I I		
	W L L L L		
	F F F		
	W W W		
A-PG-3L	R G L R G L Y L R F R R L V S V G R	0,327	0,43
A-PG-IL	R G L R G L Y F R F R R I L S V G R	0,364	0,45
A-PG-4LF	R G I R G L Y L R W R R L L S F G R	0,417	0,47
A-PG-3-LF	R G F R G L Y L R W R R L V S V G R	0,359	0,46

Dans le tableau 2 ci-dessus, le peptide A-Synb1 est un dérivé de SynB1 dans lequel les paires d'acides aminés en position 3 et 5, en position 10 et 12 et en position 16 et 17 ont été permutées.

2) Mutation du peptide SynB3.

2.1) Augmentation de l'hydrophobicité <H> de SynB3.

Les mutations suivantes augmentent le paramètre <H>, c'est-à-dire l'hydrophobicité moyenne par résidus :

- la mutation simultanée des résidus en position 4 et 6 ou la mutation simultanée des résidus en position 4, 5 et 6 par des acides aminés hydrophobes, de préférence choisi parmi le groupe comprenant : Ala, Ileu, Leu, Val, Phe, Trp,

- éventuellement, la mutation d'un moins un autre résidu, de préférence le résidu Phe en position 10,

par un résidu Tyr ou Trp donnant un signal spectroscopique et permettant le dosage du peptide.

Le tableau 3 ci-dessous rapporte des mutations permettant d'augmenter l'hydrophobicité de SynB3 et donne des exemples de peptides selon l'invention dérivés de SynB3.

Tableau 3

		$\langle H \rangle$	$\langle mH \rangle_{\alpha}$	$\langle \mu H \rangle_{\beta}$
SynB3	R R L S Y S R R R F	-0,068	0,42	0,01
	A A A			
	I I I			
	L L L			
	V V V			
	F F F			
	W W W			
SM4287	R R L W Y L R R R F	0,335	0,46	0,40
SM4288	R R L W L L R R R F	0,409	0,39	0,34

2.2) Augmentation de l'amphipathicité hélicoïdale par résidu $\langle \mu H \rangle_{\alpha}$ de SynB3.

Les mutations suivantes permettent d'augmenter le paramètre $\langle H \rangle$ et $\langle \mu H \rangle_{\alpha}$ du peptide SynB3, c'est-à-dire l'hydrophobicité moyenne par résidu et l'amphipathicité hélicoïdale moyenne par résidu de ce peptide :

- la permutation des résidus en position 5 et 7 et la mutation simultanée, sur la séquence résultant de la permutation, des résidus en position 4 et 6 ou des résidus en position 4, 6 et 7 par des acides aminés hydrophobes de préférence choisi parmi le groupe comprenant : Ala, Ileu, Leu, Val, Phe et Trp,

- éventuellement, la mutation d'un moins un autre résidu, de préférence le résidu Phe en position 10, par un résidu Tyr ou Trp donnant un signal spectroscopique et permettant le dosage du peptide.

Le tableau 4 ci-dessous rapporte des mutations permettant d'augmenter l'hydrophobicité moyenne par résidu et l'amphipathicité hélicoïdale moyenne par résidu de SynB3 et donne des exemples de peptides selon l'invention dérivés de SynB3.

Tableau 4

		<H>	< μ H> α	< μ H> β
SynB3	R R L S Y S R R R F	-0,068	0,42	0,01
	A A A			
	I I I			
	L L L			
	V V V			
	F F F			
	W W W			
SM4289	R R L W R L Y R R F	0,335	0,82	0,4
SM4290	R R L W R L L R R F	0,409	0,88	0,34

2.3) Augmentation de l'amphipathicité bêta < μ H> β de SynB3.

Les mutations suivantes permettent d'augmenter le paramètre <H> et < μ H> β du peptide SynB3, c'est-à-dire l'hydrophobicité moyenne par résidus et l'amphipathicité bêta moyenne par résidu < μ H> β de ce peptide :

- la permutation des résidus en position 2 et 3 et la permutation des résidus en position 5 et 8, et sur la séquence résultant de la permutation, la mutation simultanée des résidus en position 4 et 6 ou la mutation simultanée des résidus en position 4, 6 et 8 par des acides aminés hydrophobes de préférence choisis parmi le groupe comprenant : Ala, Ileu, Leu, Val, Phe et Trp,

- éventuellement, la mutation d'au moins un autre résidu, de préférence le résidu Phe en position 10, par un résidu Tyr ou Trp donnant un signal spectroscopique et permettant le dosage du peptide.

Le tableau 5 ci-dessous rapporte des mutations permettant d'augmenter le paramètre $\langle H \rangle$ et $\langle \mu H \rangle \beta$ du peptide SynB3 et donne des exemples de peptides selon l'invention dérivés de SynB3.

Tableau 5

		$\langle H \rangle$	$\langle \mu H \rangle \alpha$	$\langle \mu H \rangle \beta$
SynB3	R R L S Y S R R R F	-0,068	0,42	0,01
	R L R S R S R Y R F			
	A A A			
	I I I			
	L L L			
	V V V			
	F F F			
	W W W			
SM4291	R L R W R L R Y R F	0,335	0,35	1,1
SM4292	R L R W R L R L R F	0,409	0,36	1,1

3) Mutation du peptide SynB4.

3.1) Augmentation de l'hydrophobicité $\langle H \rangle$ de SynB3.

Les mutations suivantes augmentent le paramètre $\langle H \rangle$, c'est-à-dire l'hydrophobicité moyenne par résidus :

- la mutation simultanée des résidus en position 3, 7, 12, 16 par des acides aminés hydrophobes de préférence choisis parmi le groupe comprenant : Ala, Ileu, Leu, Val, Phe et Trp.

Le tableau 6 ci-dessous rapporte des mutations permettant d'augmenter l'hydrophobicité $\langle H \rangle$ de SynB4 et donne des exemples de peptides selon l'invention dérivés de SynB4.

Tableau 6

		<H>	< μ H> α
SynB4	A W S F R V S Y R G I S Y R R S R	0,24	0,047
	A A A A		
	I I I I		
	L L L L		
	V V V V		
	F F F F		
	W W W W		
SynB4-4A	A W A F R V A Y R G I A Y R R A R	0,32	0,047
SynB4-2AL	A W L F R V A Y R G I L Y R R A R	0,49	0,047
SynB4-FALF	A W F F R V A Y R G I L Y R R F R	0,58	0,086

3.2) Augmentation de l'amphipathicité de SynB4.

Les mutations ci-dessous augmentent les paramètres <H> et < μ H> α , c'est-à-dire l'hydrophobicité moyenne par résidu et l'amphipathicité hélicoïdale moyenne par résidu :

- une permutation des résidus en position 12 et 14, des résidus en position 16 et 17 et une mutation simultanée des résidus en position 3, 7, 14 et 17 par des acides aminés hydrophobes de préférence choisis parmi le groupe comprenant : Ala, Ileu, Leu, Val, Phe et Trp.

Le tableau 7 ci-dessous rapporte des mutations permettant d'augmenter les paramètres <H> et < μ H> α , c'est-à-dire l'hydrophobicité moyenne par résidus et l'amphipathicité hélicoïdale moyenne par résidu, de SynB4 et donne des exemples de peptides selon l'invention dérivés de SynB4.

Tableau 7

		<H>	< μ H> α
SynB4	A W S F R V S Y R G I S Y R R S R	0,24	0,047
aSynB4	A W S F R V S Y R G I R Y S R R S	0,24	0,18
	A A A A		
	V V V V		
	I I I I		
	L L L L		
	F F F F		
	W W W W		
aSynB4-2AL	A W A F R V L Y R G I R Y L R R A	0,49	0,41
aSynB4-IVFA	A W I F R V V Y R G I R Y F R R A	0,55	0,48
aSynB4-FIIL	A W F F R V I Y R G I R Y I R R L	0,67	0,55

Dans le tableau 7, aSynB4 est un peptide obtenu par une permutation des résidus en position 12 et 14 et des résidus en position 16 et 17.

L'invention concerne aussi un peptide linéaire contenant ou constitué par un dérivé d'un peptide antibiotique par :

- modification des résidus cystéines de façon à ce que ledit peptide soit dépourvu de pont disulfure,
- substitution d'une ou plusieurs arginines par la citrulline ou l'ornithine.

En effet, la substitution des arginines par des citrullines ou des ornithines permet de diminuer la toxicité éventuelle du peptide résultant du caractère cationique de l'arginine. Il est ainsi possible d'utiliser une plus grande quantité de vecteur peptidique. Toutefois, avantageusement selon la taille et le nombre d'arginine dans le peptide antibiotique d'origine, les peptides de l'invention comprennent au moins encore une, de préférence au moins encore deux et tout préférentiellement au moins encore trois arginines.

A titre d'exemple de peptides selon l'invention dont une ou plusieurs arginines sont remplacées par des citrullines (Cit), on peut citer les dérivés de SynB1, SynB3 et SynB4 du tableau 8 ci-dessous.

Tableau 8

SynB1	R G G R L S Y S R R R F S T S T G R
SynB1/2Cit	R G G R L S Y S Cit Cit R F S T S T G R
SynB1/3Cit	R G G R L S Y S Cit Cit Cit F S T S T G R
SM3979	R G G R L A Y L R R R W A V L V G R
SM3979/2Cit	R G G R L A Y L Cit Cit R W A V L V G R
SM3979/3Cit	R G G R L A Y L Cit Cit Cit W A V L V G R
SM3980	R G G R L V Y V R R R W V V V V G R
SM3980/2Cit	R G G R L V Y V Cit Cit R W V V V V G R
SM3980/3Cit	R G G R L V Y V Cit Cit Cit W V V V V G R
SynB3	R R L S Y S R R R F
SynB3/2Cit	R R L S Y S Cit Cit R F
SynB3/3CitA	R R L S Y S Cit Cit Cit F
SynB3/3CitB	R Cit L S Y S Cit Cit R F
SM4289	R R L W R L Y R R F
SM4289/2Cit	R R L W R L Y Cit Cit F
SM4289/3Cit	R Cit L W R L Y Cit Cit F
SM4290	R R L W R L L R R F
SM4290/2Cit	R R L W R L L Cit Cit F
SM4290/3Cit	R Cit L W R L L Cit Cit F
SynB4	A W S F R V S Y R G I S Y R R S R
SynB4/2Cit	A W S F R V S Y R G I S Y Cit Cit S R
SynB4/3Cit	A W S F Cit V S Y R G I S Y Cit Cit S R
SynB4-FALF	A W F F R V A Y R G I L Y R R F R
SynB4-FALF/2Cit	A W F F R V A Y R G I L Y Cit Cit F R
SynB4-FALF/3Cit	A W F F Cit V A Y R G I L Y Cit Cit F R

Les peptides de l'invention peuvent être préparés par synthèse chimique ou par génie génétique, ils peuvent être sous forme rétro et comprendre des acides

aminés sous forme D. L'invention concerne aussi des fragments de ces peptides constitués d'au moins cinq et de préférence d'au moins sept acides aminés successifs des séquences ci-dessus.

L'invention a aussi pour objet l'utilisation de ces peptides linéaires amphipathiques ou d'analogues de ceux-ci, pour la vectorisation à travers la membrane des cellules *in vivo* ou *in vitro* d'une ou plusieurs substances actives tant pour des applications thérapeutiques que de diagnostic. Par vectorisation, on entend selon l'invention, un processus capable de traverser la ou les membranes cellulaires et d'amener ladite substance active jusqu'à une cible située dans un compartiment cellulaire tel que le cytoplasme ou le noyau.

Ainsi, l'invention a pour objet des composés formés d'au moins un peptide linéaire amphipathique de décrit précédemment lié directement ou indirectement à au moins une substance active. Ces composés peuvent être représentés par la formule (I) suivante :

A _____ B (I)

dans laquelle :

- A représente un peptide amphipathique de l'invention,
- B représente une substance active, et
- le trait horizontal représente la liaison entre la substance active et le peptide linéaire amphipathique.

A titre de substance active, l'invention envisage notamment des protéines, comme des polypeptides ou peptides, des anticorps ou partie d'anticorps, des acides nucléiques et oligonucléotides ou des ribozymes, ou encore, bien entendu, des molécules chimiques actives pour le traitement ou la prévention de pathologies humaines ou animales, comme par exemple et de manière non limitative des antitumoraux, des antiviraux, etc...

Dans le domaine du diagnostic, la substance active peut être un marqueur radioactif, un marqueur coloré, ou tout autre moyen ou substance capable de révéler un métabolisme ou une pathologie.

Le couplage entre le peptide vecteur et la substance active, symbolisé par les traits horizontaux dans la formule (I), peut être réalisé par tout moyen de liaison acceptable compte tenu de la nature chimique et de l'encombrement dans les composés de la formule (I). Les liaisons peuvent être covalentes, hydrophobes ou ioniques, clivables ou non-clivables dans les milieux physiologiques ou à l'intérieur de la cellules. La liaison peut comprendre un ou plusieurs composés intermédiaires (linker).

Le couplage peut être effectué en n'importe quel site du peptide (A), dans lequel des groupements fonctionnels tels que -OH, -SH, -COOH, -NH₂ sont naturellement présents ou ont été introduits.

Les positions de couplage pour la substance active peuvent être au niveau des extrémités N-terminale ou C-terminale ou bien au niveau des chaînes latérales du peptide. De même, le couplage peut être effectué en n'importe quel site de la substance active (B), dans laquelle des groupements fonctionnels tels que -OH, -SH, -COOH, -NH₂ sont naturellement présents ou ont été introduits.

L'invention concerne donc aussi des compositions pharmaceutiques comprenant à titre d'agent actif une quantité efficace d'au moins un composé de formule (I) dans un véhicule acceptable.

D'autres avantages et caractéristiques de l'invention apparaîtront des exemples qui suivent concernant la préparation de peptides linéaires amphipathiques, leur couplage à une substance active et la pénétration de ce conjugué dans les cellules.

1) Synthèse des peptides marqués au groupe fluorescent NBD.

Les peptides ont été synthétisés par la stratégie Fmoc-tBu en utilisant un AMS 422 (ABIMED, Allemagne). Les séquences des peptides sont indiquées dans le tableau I. Le marquage du N-terminal par un groupe fluorescent NBD a été effectué selon la procédure décrite par [Gazit, E. et al. (1995) *Biochemistry* 34, 11479-11488].

Le peptide sur résine est d'abord traité avec pipéridine [20% (v/v) dans du DMF] pour enlever le groupe protégeant Fmoc du N-terminal. Du NBD-Cl dans du DMF sec (excès de 5 fois) est ensuite rajouté en présence du DIEA (excès de 2 fois) pendant 6 hr à l'ombre avec agitation pour sélectivement marquer le groupe N-terminal. La résine est ensuite enlevée avec du DMF et traitée avec un mélange déprotégeant pour décrocher les peptides de la résine et déprotéger les chaînes latérales. Le peptide a été ensuite purifié par HPLC (reverse phase high performance liquid chromatography) (Water-prep LC 40, Water) avec un gradient TFA 0,01%/ acétonitrile. La pureté des peptides a été mesurée par des critères d'absorbance UV à 220 nm et 460 nm et était de 95%.

2) Préparation des peptides couplés à la doxorubicine.

Le couplage de la doxorubicine sur un peptide par l'intermédiaire du maillon succinique est effectué en 3 étapes.

Au chlorhydrate de doxorubicine (1 eq), solubilisé dans diméthylformamide (DMF) en présence de Disopropyléthylamine (DIEA, 2 eq) est ajouté l'anhydride succinique (1,1 eq, dissous dans DMF). Après une incubation de 20 min à température ambiante, l'hémisuccinate de doxorubicine ainsi formé est ensuite activé par addition de PyBOP (Benzotriazol-1-yl-oxopyrrolidinephosphonium Hexafluorophosphate 1,1 eq dans DMF) et DIEA (2 eq). Ce second mélange réactionnel est incubé 20 min. Le peptide (1,2 eq dans DMF) est ensuite ajouté au mélange réactionnel,

et se couple spontanément sur l'hémisuccinate de doxorubicine activé au cours d'une incubation supplémentaire de 20 min.

Le produit de couplage est ensuite purifié sur HPLC (Chromatographie liquide haute pression) préparative, puis lyophilisé.

Chacune des étapes, ainsi que le produit final sont contrôlés par HPLC analytique et spectrométrie de masse.

Les peptides testés sont donnés dans le tableau 9 ci-dessous.

Tableau 9

Peptide	Séquence
SynB1	RGGRLSYSRRRFSTSTGR
SM3979	RGGRLAYLRRRWAVLVGR
SM3980	RGGRLVYVRRRWVVVGR
SM3505 (SynB3)	RRLSYSRRRF
SM4287	RRLWYLRRRF
SM4288	RRLWLLRRRF
SM4289	RRLWRLYRRF
SM4290	RRLWRLRRF
SM4291	RLRWRLRYRF
SM4292	RLRWRLRLRF
SM4293	RKLWYLKRF

3) Pénétration Cellulaire.

La pénétration cellulaire des peptides a été étudiée par cytométrie de flux. Les cellules K562 sont cultivées dans du milieu RPMI avec 10% de sérum de veau fœtal. Les cellules sont diluées à $0,3 \times 10^6$ cellules par ml 24 heures avant l'expérience. La pénétration cellulaire a été mesurée par cytométrie de flux en utilisant un FACScan (Becton Dickinson, USA). Les peptides marqués au NBD (concentration finale 1 μ M) sont incubés avec les cellules K562 (5×10^5 cellules par ml) dans un milieu Optimem à 37°C

pendant des temps variables (le volume final était de 0,5 ml). Après l'incubation, les cellules sont lavées deux fois et ensuite resuspendues dans 0,5 ml de PBS froid. La pénétration a été ensuite analysée par FACS. Les fluorophores sont excités à 488 nm et la fluorescence est mesurée à 525 nm. Un histogramme de l'intensité de fluorescence (pour 1×10^4 cellules) est obtenu et la moyenne de distribution était considérée comme représentative de la quantité de peptide associé aux cellules.

4) Résultats.

Les résultats d'internalisation sont rapportés dans les tableaux ci-dessous.

Le tableau 10 montre la pénétration du peptide SM2363 par rapport à celle de deux de ces analogues qui sont plus amphipathiques.

Tableau 10

Temps (min)	SynB1	SM3979	SM3980
0	4	4	4
5	7	75	34
10	7	95	42
30	8	100	54
60	12	114	62

Les résultats du tableau 10 montrent que les analogues amphipathiques (SM3979 et SM3980) pénètrent avec beaucoup plus d'efficacité, et ceci quel que soit le temps considéré. Ainsi au temps 60 min, la pénétration du SM3979 et du SM3980 est respectivement 9 et 5 fois supérieure à celle du SynB1.

Le même design a été réalisé chez des peptides plus courts. Le peptide SynB3 a été pris comme référence et son amphipathie a été augmentée. La comparaison de

pénétration du peptide SynB3 avec ces analogues est représentée dans les tableaux 11 et 12 ci-dessous.

Tableau 11

Temps (min)	SynB3	SM4287	SM4288	SM4289	SM4290
0	4	4	4	4	4
5	9,5	29	33	63	147
10	10	34	38	80	168
30	12	50	53	107	366
60	16	60	61	135	371

Tableau 12

Temps (min)	SynB3	SM4291	SM4292	SM4293
0	4,5	4,5	4,5	4,5
10	12	91	140	20
20	13	99	140	23
30	15	107	141	29
60	23	118	146	31

Les résultats des tableaux 11 et 12 montrent aussi que les analogues amphipathiques pénètrent avec beaucoup plus d'efficacité, et ceci quel que soit le temps considéré.

5) Utilisation des peptides de l'invention comme vecteurs pour le transfert d'une molécule active à travers la barrière hémato-encéphalique (BHE).

Dans de nombreuses maladies du système nerveux central, les molécules administrées ne passent pas la barrière hémato-encéphalique et ne peuvent donc pas atteindre leur cible dans le cerveau.

a) Conditions Expérimentales.i) Préparation du SynB1 /3Cit-Doxorubicine.

Le couplage de la doxorubicine sur le peptide SynB1/3Cit par l'intermédiaire du maillon succinique est effectué en 3 étapes :

Au chlorhydrate de doxorubicine (1 eq), solubilisé dans diméthylformamide (DMF) en présence de Disopropyléthylamine (DIEA, 2 eq) est ajouté l'anhydride succinique (1,1 eq, dissous dans DMF).

Après une incubation de 20 min à température ambiante, l'hémisuccinate de doxorubicine ainsi formé est ensuite activé par addition de PyBOP (Benzotriazol-1-yl-oxopyrrolidinephosphonium Hexafluorophosphate, 1,1 eq dans DMF) et DIEA (2 eq). Ce second mélange réactionnel est incubé 20 min.

Le peptide SynB1/3Cit (1.2 eq dans DMF) est ensuite ajouté au mélange réactionnel, et se couple spontanément sur l'hémisuccinate de doxorubicine activé au cours d'une incubation supplémentaire de 20 min.

Le produit de couplage est ensuite purifié sur HPLC (Chromatographie liquide haute pression) préparative, puis lyophilisé.

Chacune des étapes, ainsi que le produit final sont contrôlés par HPLC analytique et spectrométrie de masse.

ii) Produits testés.

Doxo	Doxo
Doxo-SynB1/3Cit	doxo-(RGGRLSYSCitCitCitFSTSTGR)

iii) Perfusion Cérébrale *in situ*.

C'est une méthode rapide et sensible pour évaluer la pénétration de divers composés dans le système

nerveux central. Des souris jeunes (25-30 g, Iffa-Credo ; l'Arbresle, France) sont anesthésiées. Après exposition de la carotide commune, l'artère carotide externe droite est liée au niveau de la bifurcation avec la carotide interne et la carotide commune est liée entre le cœur et le site d'implantation du cathéter (cathéter polyéthylène, ID :0.76). Celui-ci préalablement rempli par une solution d'héparine (100 unités/ml) est inséré dans la carotide commune. Les souris sont perfusées avec le tampon de perfusion (128 mM NaCl, 24 mM NaHCO₃, 4,2 mM KCl, 2,4 mM NaH₂PO₄, 1,5 mM CaCl₂, 0,9 mM MgSO₄, et 9 mM D-glucose). Ce tampon est filtré puis bullé par un mélange contenant 95% O₂/5% CO₂ afin de maintenir le pH proche de 7,4 et d'alimenter le cerveau en oxygène au cours de la perfusion.

Les souris sont perfusées avec le tampon contenant la doxorubicine libre ou la doxo-SynB1/3Cit. Dans chaque produit, la doxorubicine est radiomarquée au carbone 14 (activité spécifique : 9,4 µCi/mg, Amersham, France). Les produits sont perfusés à la concentration de 0,33 µCi/ml ou 0,035 mg/souris.

Juste avant le début de la perfusion, le cœur est arrêté par section des ventricules, ceci afin d'éviter au cours de la perfusion un reflux du perfusat. L'hémisphère droit est alors perfusé à une vitesse de 10 ml/min pendant 60 secondes après quoi la souris est décapitée.

b) Résultats de la perfusion cérébrale *in situ*.

Dans cette étude, nous avons comparé la pénétration dans la BHE de la doxorubicine seule avec la doxorubicine vectorisée avec SynB1/3Cit. Après 60 secondes de perfusion dans le tampon, la pénétration des produits est estimée par la constante d'influx ou Kin en µl/sec/g. La figure 1 montre que la vectorisation de la doxorubicine par le vecteur SynB1/3Cit augmente son passage dans le cerveau de 20 fois après une perfusion de 60 secondes dans du tampon.

REVENDEICATIONS

1) Peptide contenant ou constitué par un dérivé d'un peptide antibiotique par :

- modification des résidus cystéines de façon à ce que ledit peptide soit dépourvu de pont disulfure,
- substitution de 1 à 18 et de préférence de 1 à 6 acides aminés, et/ou permutation d'au moins une paire d'acides aminés, lesdites substitutions et/ou permutations étant telles que ledit peptide présente un caractère amphipathique.

2) Peptide selon la revendication 1, caractérisé en ce qu'il présente une hydrophobicité moyenne par résidu $\langle H \rangle$ comprise entre 0,15 et 0,7.

3) Peptide selon l'une des revendications 1 ou 2, caractérisé en ce qu'il présente un moment d'hydrophobicité hélicoïdal $\langle \mu H \rangle_{\alpha}$ supérieur à 0,15.

4) Peptide selon l'une des revendications 1 à 3, caractérisé en ce qu'il présente un moment d'hydrophobicité bêta $\langle \mu H \rangle_{\beta}$ supérieur à 0.

5) Peptide selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, caractérisé en ce qu'il est dérivé de protégrine ou de tachyplésine, d'un analogue ou d'un fragment de ceux-ci.

6) Peptide comprenant ou constitué par un dérivé d'un peptide dont la séquence en acides aminés est choisi parmi :

	1	5	10	15	18													
- SEQ ID NO:1 :	R	G	G	R	L	S	Y	S	R	R	R	F	S	T	S	T	G	R
	1	5	10															
- SEQ ID NO:2 :	R	R	L	S	Y	S	R	R	R	F								
	1	5	10								15	17						

- SEQ ID NO:3 : A W S F R V S Y R G I S Y R R S R
ou un fragment de celles-ci constitué d'au moins cinq et de préférence d'au moins sept acides aminés successifs,
par substitution de 1 à 18 et de préférence de 1 à 6 acides aminés, et/ou permutation d'au moins une paire d'acides aminés, lesdites substitutions et/ou permutations étant telles que ledit peptide présente un caractère amphipathique.

7) Peptide selon la revendication 6, caractérisé en ce qu'il dérive d'un peptide dont la séquence en acides aminés est SEQ ID NO:1 par mutation d'au moins un des résidus en position 6, 8, 13, 14, 15, 16 par un acide aminé hydrophobe, de préférence choisi parmi le groupe comprenant : Ala, Ile, Leu, Val, Phe, Trp, et éventuellement mutation d'au moins un autre résidu, de préférence le résidu Phe en position 12, par un résidu tyr ou Trp.

8) Peptide selon la revendication 7, caractérisé par l'un des séquences en acides aminés suivantes :

- SEQ ID NO:4 : R G G R L A Y L R R R W A V L V G R,
- SEQ ID NO:5 : R G G R L V Y V R R R W V V V V G R,
- SEQ ID NO:6 : R G G R L L Y L R R R W L V L V G R,
- SEQ ID NO:7 : R G G R L A Y A R R R F A V A V G R,
- SEQ ID NO:8 : R G G R L V Y L R R R F A F L I G R.

9) Peptide selon l'une des revendication 6 à 8, caractérisé en ce qu'il dérive d'un peptide dont la séquence en acides aminés est SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:7 ou SEQ ID NO:8 par permutation d'au moins une paire des résidus en position 3 et 5, en position 10 et 12, et en position 16 et 17.

10) Peptide selon l'une des revendication 6 à 9, caractérisé en ce qu'il dérive d'un peptide dont la séquence en acides aminés est SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:7 ou SEQ ID NO:8 par :

- permutation d'au moins une paire des résidus en position 3 et 5, en position 10 et 12, et en position 16 et 17,

- mutation d'au moins un des résidus en position 6, 13, 14 et 16 par un acide aminé hydrophobe, de préférence choisi parmi le groupe comprenant : Ala, Ile, Leu, Val, Phe, Trp, et éventuellement mutation d'au moins un autre résidu, de préférence le résidu Phe en position 12, par un résidu Tyr ou Trp donnant un signal spectroscopique et permettant le dosage du peptide,

- éventuellement mutation du résidu en position 3 par un acide aminé hydrophobe, de préférence choisi parmi le groupe comprenant : Ile, Leu, Val, Phe, Trp.

11) Peptide selon l'une des revendications 9 ou 10, caractérisé par l'une des séquences en acides aminés suivantes :

- SEQ ID NO:9 : R G L R G S Y S R F R R S T S T G R,
- SEQ ID NO:10 : R G L R G L Y L R F R R L V S V G R,
- SEQ ID NO:11 : R G L R G L Y F R F R R I L S V G R,
- SEQ ID NO:12 : R G I R G L Y L R W R R L L S F G R,
- SEQ ID NO:13 : R G F R G L Y L R W R R L V S V G R.

12) Peptide selon la revendication 6, caractérisé en ce qu'il dérive d'un peptide dont la séquence en acides aminés est SEQ ID NO: 2 par mutation simultanée des résidus en position 4 et 6 ou la mutation simultanée des résidus en position 4, 5 et 6 par des acides aminés hydrophobes, de préférence choisis parmi le groupe comprenant : Ala, Ileu, Leu, Val, Phe, Trp, et éventuellement, la mutation d'un moins un autre résidu, de préférence le résidu Phe en position 10, par un résidu Tyr ou Trp donnant un signal spectroscopique et permettant le dosage du peptide.

13) Peptide selon la revendication 12, caractérisé par l'un des séquences en acides aminés suivantes :

- SEQ ID NO:14 : R R L W Y L R R R F
- SEQ ID NO:15 : R R L W L L R R R F

14) Peptide selon l'une quelconque des revendication 6, 12 ou 13, caractérisé en ce qu'il dérive d'un peptide dont la séquence en acides aminés est SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:14, SEQ ID NO:15 par permutation des résidus en position 5 et 7 et la mutation simultanée, sur la séquence résultant de la permutation, des résidus en position 4 et 6 ou des résidus en position 4, 6 et 7 par des acides aminés hydrophobes de préférence choisis parmi le groupe comprenant : Ala, Ileu, Leu, Val, Phe et Trp, et éventuellement, mutation d'un moins un autre résidu, de préférence le résidu Phe en position 10, par un résidu Tyr ou Trp donnant un signal spectroscopique et permettant le dosage du peptide.

15) Peptide selon la revendication 14, caractérisé par l'un des séquences en acides aminés suivantes :

- SEQ ID NO:16 : R R L W R L Y R R F
- SEQ ID NO:17 : R R L W R L L R R F

16) Peptide selon l'une quelconque des revendication 6, 12, 13, 14 ou 15, caractérisé en ce qu'il dérive d'un peptide dont la séquence en acides aminés est SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:14, SEQ ID NO:15, SEQ ID NO:16 ou SEQ ID NO:17 par permutation des résidus en position 2 et 3 et la permutation des résidus en position 5 et 8, et sur la séquence résultant de la permutation, la mutation simultanée des résidus en position 4 et 6 ou la mutation simultanée des résidus en position 4, 6 et 8 par des acides aminés hydrophobes de préférence choisis parmi le groupe comprenant : Ala, Ileu, Leu, Val, Phe et Trp, et éventuellement, mutation d'un moins un autre résidu, de préférence le résidu Phe en position 10, par un résidu Tyr ou Trp donnant un signal spectroscopique et permettant le dosage du peptide.

17) Peptide selon la revendication 16, caractérisé par l'un des séquences en acides aminés suivantes :

- SEQ ID NO:18 : R L R W R L R Y R F
- SEQ ID NO:19 : R L R W R L R L R F

18) Peptide selon la revendication 6, caractérisé en ce qu'il dérive d'un peptide dont la séquence en acides aminés est SEQ ID NO: 3 par mutation simultanée des résidus en position 3, 7, 12, 16 par des acides aminés hydrophobes de préférence choisis parmi le groupe comprenant : Ala, Ileu, Leu, Val, Phe et Trp.

19) Peptide selon la revendication 18, caractérisé par l'une des séquences en acides aminés suivantes :

- SEQ ID NO: 20 : A W A F R V A Y R G I A Y R R A R
- SEQ ID NO: 21 : A W L F R V A Y R G I L Y R R A R
- SEQ ID NO: 22 : A W F F R V A Y R G I L Y R R F R

20) Peptide selon l'une quelconque des revendication 6 ou 19, caractérisé en ce qu'il dérive d'un peptide dont la séquence en acides aminés est SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:20, SEQ ID NO:21 ou SEQ ID NO:22 par permutation des résidus en position 12 et 14, des résidus en position 16 et 17 et une mutation simultanée des résidus en position 3, 7, 14 et 17 par des acides aminés hydrophobes de préférence choisis parmi le groupe comprenant : Ala, Ileu, Leu, Val, Phe et Trp.

21) Peptide selon la revendication 20, caractérisé par l'une des séquences en acides aminés suivantes :

- SEQ ID NO: 23 : A W A F R V L Y R G I R Y L R R A
- SEQ ID NO: 24 : A W I F R V V Y R G I R Y F R R A
- SEQ ID NO: 25 : A W F F R V I Y R G I R Y I R R L

22) Peptides selon l'une quelconques des revendications 1 à 21, caractérisé en ce que la substitution d'une ou plusieurs arginines par la citrulline ou l'ornithine.

23) Peptide selon la revendication 22, caractérisé par l'une des séquences en acides aminés suivantes :

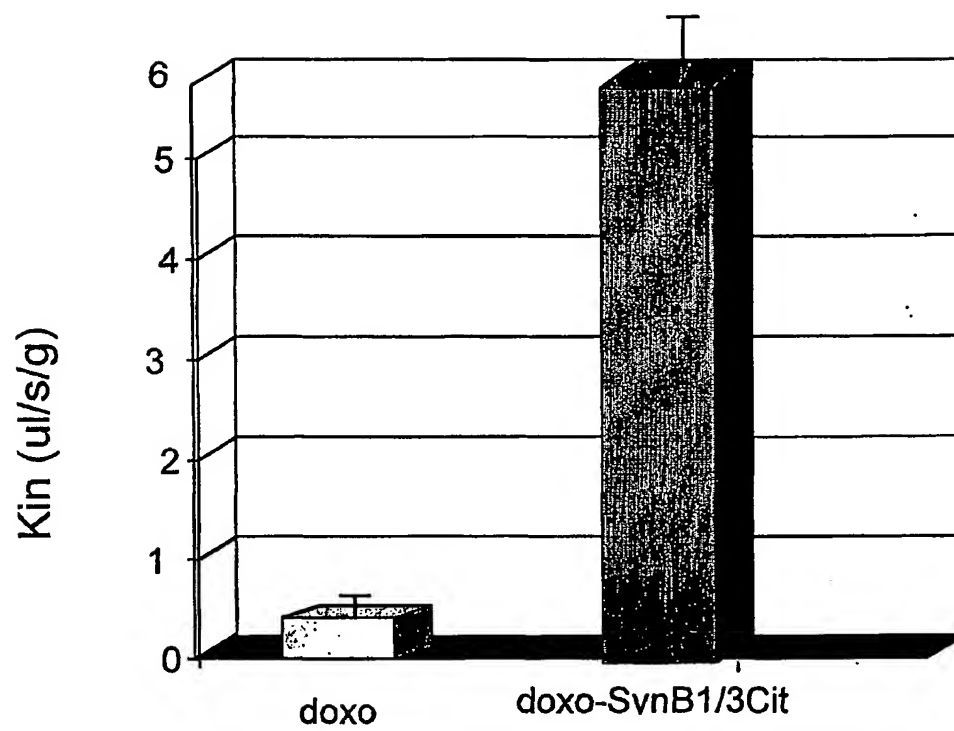
- SEQ ID NO: 26 : R G G R L S Y S Cit Cit R F S T S T G R
- SEQ ID NO: 27 : R G G R L S Y S Cit Cit Cit F S T S T G R
- SEQ ID NO: 28 : R G G R L A Y L Cit Cit R W A V L V G R
- SEQ ID NO: 29 : R G G R L A Y L Cit Cit Cit W A V L V G R
- SEQ ID NO: 30 : R G G R L V Y V Cit Cit R W V V V V G R
- SEQ ID NO: 31 : R G G R L V Y V Cit Cit Cit W V V V V G R
- SEQ ID NO: 32 : R R L S Y S Cit Cit R F
- SEQ ID NO: 33 : R R L S Y S Cit Cit Cit F
- SEQ ID NO: 34 : R Cit L S Y S Cit Cit R F
- SEQ ID NO: 35 : R R L W R L Y Cit Cit F
- SEQ ID NO: 36 : R Cit L W R L Y Cit Cit F
- SEQ ID NO: 37 : R R L W R L L Cit Cit F
- SEQ ID NO: 38 : R Cit L W R L L Cit Cit F
- SEQ ID NO: 39 : A W S F R V S Y R G I S Y Cit Cit S R
- SEQ ID NO: 40 : A W S F Cit V S Y R G I S Y Cit Cit S R
- SEQ ID NO: 41 : A W F F R V A Y R G I L Y Cit Cit F R
- SEQ ID NO: 42 : A W F F Cit V A Y R G I L Y Cit Cit F R

24) Un composé formé d'au moins un peptide selon l'une quelconque des revendications 1 à 23 lié directement ou indirectement à au moins une substance active.

25) Un composition pharmaceutique comprenant à titre d'agent actif une quantité efficace d'au moins un composé selon la revendication 24 dans un véhicule acceptable.

1/1

Figure 1



SEQUENCE LISTING

<110> SYNT:EM SA

<120> Peptides linéaires amphiphatiques et les compositions les contenant

<130> 6139PCT

<140> 6139PCT

<141> 2001-07-03

<150> FR00/08633

<151> 2000-07-03

<160> 42

<170> PatentIn version 3.0

<210> 1

<211> 18

<212> PRT

<213> unidentified

<220>

<221> PEPTIDE

<222> (1)..(18)

<223> Peptide SynB1

<400> 1

Arg	Gly	Gly	Arg	Leu	Ser	Tyr	Ser	Arg	Arg	Arg	Phe	Ser	Thr	Ser	Thr
1				5					10					15	

Gly Arg

<210> 2

<211> 10

<212> PRT

<213> unidentified

<220>

<221> PEPTIDE

<222> (1)..(10)

<223> Peptide SynB3

<400> 2

Arg	Arg	Leu	Ser	Tyr	Ser	Arg	Arg	Arg	Phe
1					5				10

<210> 3

<211> 17

<212> PRT

<213> unidentified

<220>

<221> PEPTIDE

<222> (1)..(17)

<223> Peptide SynB4 <

400> 3

Ala Trp Ser Phe Arg Val Ser Tyr Arg Gly Ile Ser Tyr Arg Arg Ser

1 5 10 15

Arg

<210> 4
<211> 18
<212> PRT
<213> unidentified
<220>
<221> PEPTIDE
<222> (1)..(18)
<223> peptide SM3979
<400> 4

Arg Gly Gly Arg Leu Ala Tyr Leu Arg Arg Arg Trp Ala Val Leu Val
1 5 10 15

Gly Arg

<210> 5
<211> 18
<212> PRT
<213> unidentified
<220>
<221> PEPTIDE
<222> (1)..(18)
<223> Peptide SM3980
<400> 5

Arg Gly Gly Arg Leu Val Tyr Val Arg Arg Arg Trp Val Val Val Val
1 5 10 15

Gly Arg

<210> 6
<211> 18
<212> PRT
<213> unidentified
<220>
<221> PEPTIDE
<222> (1)..(18)
<223> Peptide PG-4L
<400> 6

Arg Gly Gly Arg Leu Leu Tyr Leu Arg Arg Arg Trp Leu Val Leu Val
1 5 10 15

Gly Arg

<210> 7
<211> 18
<212> PRT
<213> unidentified
<220>
<221> PEPTIDE

<222> (1)..(18)
<223> Peptide PG-4A
<400> 7

Arg Gly Gly Arg Leu Ala Tyr Ala Arg Arg Arg Phe Ala Val Ala Val
1 5 10 15

Gly Arg

<210> 8
<211> 18
<212> PRT
<213> unidentified
<220>
<221> PEPTIDE
<222> (1)..(18)
<223> Peptide PG-AF11
<400> 8

Arg Gly Gly Arg Leu Val Tyr Leu Arg Arg Arg Phe Ala Phe Leu Ile
1 5 10 15

Gly Arg

<210> 9
<211> 18
<212> PRT
<213> unidentified
<220> <221> PEPTIDE
<222> (1)..(18)
<223> Peptide A-SynB1
<400> 9

Arg Gly Leu Arg Gly Ser Tyr Ser Arg Phe Arg Arg Ser Thr Ser Thr
1 5 10 15

Gly Arg

<210> 10
<211> 18
<212> PRT
<213> unidentified
<220>
<221> PEPTIDE
<222> (1)..(18)
<223> Peptide A-PG-3L
<400> 10

Arg Gly Leu Arg Gly Leu Tyr Leu Arg Phe Arg Arg Leu Val Ser Val
1 5 10 15

Gly Arg

<210> 11
<211> 18

<212> PRT
 <213> unidentified
 <220>
 <221> PEPTIDE
 <222> (1)..(18)
 <223> Peptide A-PG-IL
 <400> 11

Arg Gly Leu Arg Gly Leu Tyr Phe Arg Phe Arg Arg Ile Leu Ser Val
 1 5 10 15

Gly Arg

<210> 12
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> unidentified
 <220>
 <221> PEPTIDE
 <222> (1)..(18)
 <223> Peptide A-PG-4LF
 <400> 12

Arg Gly Ile Arg Gly Leu Tyr Leu Arg Trp Arg Arg Leu Leu Ser Phe
 1 5 10 15

Gly Arg

<210> 13
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> unidentified
 <220>
 <221> PEPTIDE
 <222> (1)..(18)
 <223> Peptide A-PG-3LF
 <400> 13

Arg Gly Phe Arg Gly Leu Tyr Leu Arg Trp Arg Arg Leu Val Ser Val
 1 5 10 15

Gly Arg

<210> 14
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> unidentified
 <220>
 <221> PEPTIDE
 <222> (1)..(10)
 <223> Peptide SM4287
 <400> 14

Arg Arg Leu Trp Tyr Leu Arg Arg Arg Phe
 1 5 10

<210> 15
<211> 10
<212> PRT
<213> unidentified
<220>
<221> PEPTIDE
<222> (1)..(10)
<223> Peptide SM4288
<400> 15

Arg Arg Leu Trp Leu Arg Arg Arg Phe
1 5 10

<210> 16
<211> 10
<212> PRT
<213> unidentified
<220>
<221> PEPTIDE
<222> (1)..(10)
<223> Peptide SM4289
<400> 16

Arg Arg Leu Trp Arg Leu Tyr Arg Arg Phe
1 5 10

<210> 17
<211> 10
<212> PRT
<213> unidentified
<220>
<221> PEPTIDE
<222> (1)..(10)
<223> Peptide SM4290
<400> 17

Arg Arg Leu Trp Arg Leu Arg Arg Phe
1 5 10

<210> 18
<211> 10
<212> PRT
<213> unidentified
<220>
<221> PEPTIDE
<222> (1)..(10)
<223> Peptide SM4291
<400> 18

Arg Leu Arg Trp Arg Leu Arg Tyr Arg Phe
1 5 10

<210> 19
<211> 10
<212> PRT
<213> unidentified
<220>
<221> PEPTIDE
<222> (1)..(10)

<223> Peptide SynB4-4A
<400> 19

Arg Leu Arg Trp Arg Leu Arg Leu Arg Phe
1 5 10

<210> 20
<211> 17
<212> PRT
<213> unidentified
<220>
<221> PEPTIDE
<222> (1)..(17)
<223> Peptide SynB4-4A
<400> 20

Ala Trp Ala Phe Arg Val Ala Tyr Arg Gly Ile Ala Tyr Arg Arg Ala
1 5 10 15

Arg

<210> 21
<211> 17
<212> PRT
<213> unidentified
<220>
<221> PEPTIDE
<222> (1)..(17)
<223> Peptide SynB4-2AL
<400> 21

Ala Trp Leu Phe Arg Val Ala Tyr Arg Gly Ile Leu Tyr Arg Arg Ala
1 5 10 15

Arg

<210> 22
<211> 17
<212> PRT
<213> unidentified
<220>
<221> PEPTIDE
<222> (1)..(17)
<223> Peptide SynB4-4A
<400> 22

Ala Trp Phe Phe Arg Val Ala Tyr Arg Gly Ile Leu Tyr Arg Arg Phe
1 5 10 15

Arg

<210> 23
<211> 17
<212> PRT
<213> unidentified
<220>

<221> PEPTIDE
<222> (1)..(17)
<223> Peptide aSynB4-2AL
<400> 23

Ala Trp Ala Phe Arg Val Leu Tyr Arg Gly Ile Arg Tyr Leu Arg Arg
1 5 10 15

Ala

<210> 24
<211> 17
<212> PRT
<213> unidentified
<220>
<221> PEPTIDE
<222> (1)..(17)
<223> Peptide aSynB4-IVFA
<400> 24

Ala Trp Ile Phe Arg Val Val Tyr Arg Gly Ile Arg Tyr Phe Arg Arg
1 5 10 15

Ala

<210> 25
<211> 17
<212> PRT
<213> unidentified
<220>
<221> PEPTIDE
<222> (1)..(17)
<223> Peptide aSynB4-FIIL
<400> 25

Ala Trp Phe Phe Arg Val Ile Tyr Arg Gly Ile Arg Tyr Ile Arg Arg
1 5 10 15

Leu

<210> 26
<211> 18
<212> PRT
<213> unidentified
<220>
<221> PEPTIDE
<222> (1)..(18)
<223> Peptide SynB/2cit
<220>
<221> VARIANT
<222> (9)..(10)
<223> Résidus citrulline en position 9 et 10
<400> 26

Arg Gly Gly Arg Leu Ser Tyr Ser Xaa Xaa Arg Phe Ser Thr Ser Thr
1 5 10 15

Gly Arg

<210> 27
<211> 18
<212> PRT
<213> unidentified
<220>
<221> PEPTIDE
<222> (1)..(18)
<223> Peptide SynB1/3cit
<220>
<221> VARIANT
<222> (9)..(11)
<223> Résidus citrulline en position 9, 10 et 11
<400> 27

Arg Gly Gly Arg Leu Ser Tyr Ser Xaa Xaa Xaa Phe Ser Thr Ser Thr
1 5 10 15

Gly Arg

<210> 28
<211> 18
<212> PRT
<213> unidentified
<220>
<221> PEPTIDE
<222> (1)..(18)
<223> Peptide SM3979/2cit
<220>
<221> VARIANT
<222> (9)..(10)
<223> Résidus citrulline en position 9 et 10
<400> 28

Arg Gly Gly Arg Leu Ala Tyr Leu Xaa Xaa Arg Trp Ala Val Leu Val
1 5 10 15

Gly Arg

<210> 29
<211> 18
<212> PRT
<213> unidentified
<220>
<221> PEPTIDE
<222> (1)..(18)
<223> Peptide SM3979/3cit
<220>
<221> VARIANT
<222> (9)..(11)
<223> Résidus citrulline en position 9, 10 et 11
<400> 29

Arg Gly Gly Arg Leu Ala Tyr Leu Xaa Xaa Xaa Trp Ala Val Leu Val

1 5 10 15

Gly Arg

<210> 30
<211> 18
<212> PRT
<213> unidentified
<220>
<221> PEPTIDE
<222> (1)..(18)
<223> Peptide SM3980/2cit
<220>
<221> VARIANT
<222> (9)..(10)
<223> Résidus citrulline en position 9 et 10
<400> 30

Arg Gly Gly Arg Leu Val Tyr Val Xaa Xaa Arg Trp Val Val Val Val
1 5 10 15

Gly Arg

<210> 31
<211> 18
<212> PRT
<213> unidentified
<220>
<221> PEPTIDE
<222> (1)..(18)
<223> Peptide SM3980/3cit
<220>
<221> VARIANT
<222> (9)..(11)
<223> Résidus citrulline en position 9, 10 et 11
<400> 31

Arg Gly Gly Arg Leu Val Tyr Val Xaa Xaa Xaa Trp Val Val Val Val
1 5 10 15

Gly Arg

<210> 32
<211> 10
<212> PRT
<213> unidentified
<220>
<221> PEPTIDE
<222> (1)..(10)
<223> Peptide SynB3/2cit
<220>
<221> VARIANT
<222> (7)..(8)
<223> Résidus citrulline en position 7 et 8
<400> 32

Arg Arg Leu Ser Tyr Ser Xaa Xaa Arg Phe
1 5 10

<210> 33
<211> 10
<212> PRT
<213> unidentified
<220>
<221> PEPTIDE
<222> (1)..(10)
<223> Peptide SynB3/3citA
<220>
<221> VARIANT
<222> (7)..(9)
<223> Résidus citrulline en position 7, 8 et 9
<400> 33

Arg Arg Leu Ser Tyr Ser Xaa Xaa Xaa Phe
1 5 10

<210> 34
<211> 10
<212> PRT
<213> unidentified
<220>
<221> PEPTIDE
<222> (1)..(10)
<223> Peptide SynB3/3citB
<220>
<221> VARIANT
<222> (2)..(8)
<223> Résidus citrulline en position 2, 7 et 8
<400> 34

Arg Xaa Leu Ser Tyr Ser Xaa Xaa Arg Phe
1 5 10

<210> 35
<211> 10
<212> PRT
<213> unidentified
<220>
<221> PEPTIDE
<222> (1)..(10)
<223> SM4289/2cit
<220>
<221> VARIANT
<222> (8)..(9)
<223> Résidus citrulline en position 8 et 9
<400> 35

Arg Arg Leu Trp Arg Leu Tyr Xaa Xaa Phe
1 5 10

<210> 36
<211> 10
<212> PRT
<213> unidentified
<220>

<221> PEPTIDE
<222> (1)..(10)
<223> Peptide SM4289/3cit
<220>
<221> VARIANT
<222> (2)..(9)
<223> Résidus citrulline en position 2, 8 et 9
<400> 36

Arg Xaa Leu Trp Arg Leu Tyr Xaa Xaa Phe
1 5 10

<210> 37
<211> 10
<212> PRT
<213> unidentified
<220>
<221> PEPTIDE
<222> (1)..(10)
<223> Peptide SM4290/2cit
<220>
<221> VARIANT
<222> (8)..(9)
<223> Résidus citrulline en position 8 et 9
<400> 37

Arg Arg Leu Trp Arg Leu Leu Xaa Xaa Phe
1 5 10

<210> 38
<211> 10
<212> PRT
<213> unidentified
<220>
<221> PEPTIDE
<222> (1)..(10)
<223> Peptide SM4290/3cit
<220>
<221> VARIANT
<222> (2)..(9)
<223> Résidus citrulline en position 2, 8 et 9
<400> 38

Arg Xaa Leu Trp Arg Leu Leu Xaa Xaa Phe
1 5 10

<210> 39
<211> 17
<212> PRT
<213> unidentified
<220>
<221> PEPTIDE
<222> (1)..(17)
<223> Peptide SynB4/2cit
<220>
<221> VARIANT
<222> (14)..(15)
<223> Résidus citrulline en position 14 et 15
<400> 39

Ala Trp Ser Phe Arg Val Ser Tyr Arg Gly Ile Ser Tyr Xaa Xaa Ser
1 5 10 15

Arg

<210> 40
<211> 17
<212> PRT
<213> unidentified
<220>
<221> PEPTIDE
<222> (1)..(17)
<223> Peptide SynB4/3cit
<220>
<221> VARIANT
<222> (5)..(15)
<223> Résidus citrulline en position 5, 14 et 15
<400> 40

Ala Trp Ser Phe Xaa Val Ser Tyr Arg Gly Ile Ser Tyr Xaa Xaa Ser
1 5 10 15

Arg

<210> 41
<211> 17
<212> PRT
<213> unidentified
<220>
<221> PEPTIDE
<222> (1)..(17)
<223> Peptide SynB4-FALF/2cit
<220>
<221> VARIANT
<222> (14)..(15)
<223> Résidus citrulline en position 14 et 15
<400> 41

Ala Trp Phe Phe Arg Val Ala Tyr Arg Gly Ile Leu Tyr Xaa Xaa Phe
1 5 10 15

Arg

<210> 42
<211> 17
<212> PRT
<213> unidentified
<220>
<221> PEPTIDE
<222> (1)..(17)
<223> Peptide SynB4-FALF/3cit
<220>
<221> VARIANT
<222> (5)..(15)
<223> Résidus citrulline en position 5, 14 et 15

<400> 42

Ala Trp Phe Phe Xaa Val Ala Tyr Arg Gly Ile Leu Tyr Xaa Xaa Phe
1 5 10 15

Arg

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/FR 01/02129

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 7 C07K/08 A61K38/10 A61P31/04

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 C07K A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-internal, WPI Data, PAJ, SEQUENCE SEARCH

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 99 07728 A (CALAS BERNARD ;GRASSY GERARD (FR); SYNT EM S A (FR); CHAVANIEU ALA) 18 February 1999 (1999-02-18) page 28, line 12; claims; examples page 28, line 19	1,5,6, 24,25
X	WO 96 37508 A (UNIV CALIFORNIA LOS ANGELES) 28 November 1996 (1996-11-28) page 8, line 21 -page 20, line 26; claims; examples	1,5,6,8, 11,13, 21,24,25
A	WO 95 16776 A (PIONEER HI BRED INT) 22 June 1995 (1995-06-22) claims; examples	1,19,21, 24,25
	--- -/-	

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- *G* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

19 September 2001

Date of mailing of the international search report

27/09/2001

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax (+31-70) 340-3018

Authorized officer

Fuhr, C

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/FR 01/02129

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US 6 015 941 A (RAO A GURURAJ) 18 January 2000 (2000-01-18) claims; examples -----	1, 5, 19, 21, 24, 25

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/FR 01/02129

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9907728	A	18-02-1999	FR 2767323 A1	19-02-1999
			AU 8988998 A	01-03-1999
			EP 1003771 A1	31-05-2000
			WO 9907728 A2	18-02-1999
WO 9637508	A	28-11-1996	US 5804558 A	08-09-1998
			AU 716277 B2	24-02-2000
			AU 5874996 A	11-12-1996
			CA 2222475 A1	28-11-1996
			EP 0871654 A1	21-10-1998
			JP 11505721 T	25-05-1999
			WO 9637508 A1	28-11-1996
			US 5994306 A	30-11-1999
			US 6159936 A	12-12-2000
WO 9516776	A	22-06-1995	US 6025326 A	15-02-2000
			US 5580852 A	03-12-1996
			AT 190655 T	15-04-2000
			AU 2287095 A	03-07-1995
			CA 2179301 A1	22-06-1995
			DE 69423515 D1	20-04-2000
			DE 69423515 T2	29-06-2000
			EP 0734441 A1	02-10-1996
			WO 9516776 A1	22-06-1995
US 6015941	A	18-01-2000	NONE	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/FR 01/02129

Continuation of Box I.2

Claims nos.: 1-4

In view of the very large number of claims in the present application as well as their wording, it seems difficult, if not impossible to determine the subject matter for which protection is sought. Therefore, the present application does not fulfil the conditions of clarity and conciseness required by PCT Article 6 (see also PCT Rule 6.1(a)) to such an extent that it is not possible to carry out any meaningful search. Consequently, a search report cannot be established in respect of the present application. Consequently, the search was carried out for those parts of the application which appear to be clear (and/or concise), that is the compounds and products described in the examples and the peptides described in the list of sequences.

Claims 1 to 6 and all the other dependent claims of the present application concern a product and a compound defined by reference to a desirable characteristic or property, namely, a substitution of amino acids which provides the peptide with an amphipathic character.

The claims cover all the products or compounds having said characteristic or property, whereas the application only provides a support basis as defined by PCT Article 6 for only a very limited number of such products and compounds. In the present case, the claims lack support basis and the application lacks disclosure to such an extent that it is not possible to carry out any meaningful search on the whole spectrum covered by the claims. Notwithstanding the reasons mentioned above, the claims also lack clarity. Indeed there has been an attempt to define the product and compound by the result to be achieved. In the present case, that lack of clarity is likewise such that it is not possible to carry out any meaningful search on the whole spectrum covered by the claims.

Consequently, the search was carried out for only those parts of the claims whereof the subject matter appears to be clear, supported and sufficiently disclosed, namely those parts concerning the prepared products and compounds in the examples and described in the list of sequences.

Claims 2-4 and all the dependent claims of the present application concern a product/method defined (inter alia) by means of the following parameters: the moments of mHbeta and mHalpha water repellency and the water repellency of residue H. The use of said parameters is considered, in the present case, as resulting in a lack of clarity as defined by PCT Article 6. It is not possible to compare the parameters which the applicant has chosen to use with what is disclosed in prior art. The resulting lack of clarity is such that it is not possible to carry out any meaningful search. Consequently, the search was limited to the examples and the peptides described in the list of sequences.

The applicant's attention is drawn to the fact that claims, or parts of claims, concerning inventions in respect of which no search has been carried out need not be the subject of a preliminary examination report (PCT Rule 66.1(e)). The applicant is advised that the line of conduct adopted by the EPO acting in its capacity as International Preliminary Examination Authority is normally not to proceed with a preliminary examination of a subject matter in respect of which no search has been carried out. That attitude will remain unchanged, notwithstanding whether or not the claims have been modified, either after the search report has been received, or during any procedure under Chapter II.

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande Internationale No
PCT/FR 01/02129

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE CIB 7 C07K7/08 A61K38/10 A61P31/04		
Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB		
B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement) CIB 7 C07K A61K		
Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche		
Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, termes de recherche utilisés) EPO-Internal, WPI Data, PAJ, SEQUENCE SEARCH		
C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	WO 99 07728 A (CALAS BERNARD ;GRASSY GERARD (FR); SYNT EM S A (FR); CHAVANIEU ALA) 18 février 1999 (1999-02-18) page 28, ligne 12; revendications; exemples page 28, ligne 19	1,5,6, 24,25
X	WO 96 37508 A (UNIV CALIFORNIA LOS ANGELES) 28 novembre 1996 (1996-11-28) page 8, ligne 21 -page 20, ligne 26; revendications; exemples	1,5,6,8, 11,13, 21,24,25
A	WO 95 16776 A (PIONEER HI BRED INT) 22 juin 1995 (1995-06-22) revendications; exemples	1,19,21, 24,25
-/-		
<input checked="" type="checkbox"/> Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents <input checked="" type="checkbox"/> Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe		
* Catégories spéciales de documents cités: "A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent "E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date "L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée) "O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens "P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée "T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention "X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément "Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier "Z" document qui fait partie de la même famille de brevets		
Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée 19 septembre 2001		Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale 27/09/2001
Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Fonctionnaire autorisé Fuhr, C

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale No

PCT/FR 01/02129

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	<p>US 6 015 941 A (RAO A GURURAJ) 18 janvier 2000 (2000-01-18) revendications; exemples</p>	<p>1,5,19, 21,24,25</p>

SUITE DES RENSEIGNEMENTS INDIQUES SUR PCT/ISA/ 210

Suite du cadre I.2

Revendications nos.: 1-4

Etant donné le très grand nombre de revendications présentes dans la demande ainsi que leur libellé, il apparaît difficile, sinon impossible de déterminer l'objet pour lequel la protection est recherchée. La présente demande ne satisfait donc pas aux conditions de clarté et de concision requises à l'Article 6 PCTE (voir aussi Règle 6.1(a) PCT) à un point tel qu'une recherche significative devient impossible. Par conséquent, un rapport de recherche ne peut être établi pour la présente demande. Par conséquent, la recherche a été effectuée pour les parties de la demande qui apparaissent être claires (et/ou concises), c'est à dire les composés et composés décrites dans les exemples et les peptides décrites dans la liste des séquences.

Les revendications 1 et 6 et toutes les revendications dépendantes présentes ont trait à un produit et composé défini en faisant référence à une caractéristique ou propriété souhaitable, à savoir un substitution d'acides aminés qui donne un caractère amphipathique au peptide.

Les revendications couvrent tous les produits et composés présentant cette caractéristique ou propriété, alors que la demande ne fournit un fondement au sens de l'Article 6 PCT et/ou un exposé au sens de l'Article 5 PCT que pour un nombre très limité de tels produits et composés. Dans le cas présent, les revendications manquent de fondement et la demande manque d'exposé à un point tel qu'une recherche significative sur tout le spectre couvert par les revendications est impossible. Indépendamment des raisons évoquées ci-dessus, les revendications manquent aussi de clarté. En effet, on a cherché à définir le produit et composé au moyen du résultat à atteindre. Ce manque de clarté est, dans le cas présent, de nouveau tel qu'une recherche significative sur tout le spectre couvert par les revendications est impossible. En conséquence, la recherche n'a été effectuée que pour les parties des revendications dont l'objet apparaît être clair, fondé et suffisamment exposé, à savoir les parties concernant les produits et composés préparés dans les exemples et décrites dans la liste des séquences.

Les revendications 2-4 et toutes les revendications dépendantes présentes ont trait à un produit/procédé défini (entre autres) au moyen des paramètres suivants: les moments hydrophobicité mHbeta et mHalpha et le hydrophobicité par résidu H.

L'utilisation de ces paramètres est considérée, dans le présent contexte, comme menant à un manque de clarté au sens de l'Article 6 PCT. Il est impossible de comparer les paramètres que le déposant a choisi d'utiliser avec ce qui est révélé dans l'état de la technique. Le manque de clarté qui en découle est tel qu'une recherche significative complète est impossible. Par conséquent, la recherche a été limitée aux exemples et les peptides décrites dans la liste des séquences.

L'attention du déposant est attirée sur le fait que les revendications, ou des parties de revendications, ayant trait aux inventions pour lesquelles aucun rapport de recherche n'a été établi ne peuvent faire obligatoirement l'objet d'un rapport préliminaire d'examen (Règle 66.1(e))

SUITE DES RENSEIGNEMENTS INDIQUES SUR PCT/ISA/ 210

PCT). Le déposant est averti que la ligne de conduite adoptée par l'OEB agissant en qualité d'administration chargée de l'examen préliminaire international est, normalement, de ne pas procéder à un examen préliminaire sur un sujet n'ayant pas fait l'objet d'une recherche. Cette attitude restera inchangée, indépendamment du fait que les revendications aient ou n'aient pas été modifiées, soit après la réception du rapport de recherche, soit pendant une quelconque procédure sous le Chapitre II.

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Demande internationale No

PCT/FR 01/02129

Document brevet cité au rapport de recherche		Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
WO 9907728	A	18-02-1999	FR 2767323 A1	19-02-1999
			AU 8988998 A	01-03-1999
			EP 1003771 A1	31-05-2000
			WO 9907728 A2	18-02-1999
WO 9637508	A	28-11-1996	US 5804558 A	08-09-1998
			AU 716277 B2	24-02-2000
			AU 5874996 A	11-12-1996
			CA 2222475 A1	28-11-1996
			EP 0871654 A1	21-10-1998
			JP 11505721 T	25-05-1999
			WO 9637508 A1	28-11-1996
			US 5994306 A	30-11-1999
			US 6159936 A	12-12-2000
WO 9516776	A	22-06-1995	US 6025326 A	15-02-2000
			US 5580852 A	03-12-1996
			AT 190655 T	15-04-2000
			AU 2287095 A	03-07-1995
			CA 2179301 A1	22-06-1995
			DE 69423515 D1	20-04-2000
			DE 69423515 T2	29-06-2000
			EP 0734441 A1	02-10-1996
			WO 9516776 A1	22-06-1995
US 6015941	A	18-01-2000	AUCUN	